

UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TENOLOGIA

DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS DE MUTACIONES EN GENES  
ASOCIADOS CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA EN PACIENTES ATENDIDOS  
EN EL INSTITUTO ONCOLOGICO NACIONAL ENERO 2015 DICIEMBRE 2016

LICENCIADA KENIA ABREGO AGUDO  
CEDULA 9 702 1175

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOLOGICAS CON ESPECIALIZACION EN GENETICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR

DICIEMBRE 2017



Título de la Tesis:

"Determinación de las Frecuencias de Mutaciones en Genes Asociados con Leucemia Mieloide Aguda en Pacientes atendidos en el Instituto Oncológico Nacional. Enero 2015-Diciembre 2016"

### TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

**Doctor Carlos Ramos**  
**Presidente**

**Dra. Magaly de Chial**  
**Miembro**

**Dra. Olga Chen**  
**Miembro**

REFRENDADO POR:

**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA**  
**DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

\_\_\_\_\_

10 MAY 2018

*Todo tiene su tiempo y  
todo lo que se quiere  
debajo del cielo tiene su hora  
Eclesiastes 3 1*

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por todas las personas que de alguna manera me apoyaron me sostuvieron y colaboraron para la realizacion de este trabajo

En primer lugar quiero agradecer al director de esta investigacion Dr Carlos Ramos por su buena predisposicion y orientacion sin sus enseñanzas y conocimientos el desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible

Quiero extender mi gratitud especialmente al Dr Ernesto Fanilla por su admirable vocacion clinica y cientifica por sus sabios consejos por la perseverancia rigurosidad y responsabilidad con la que me ha enseñado a trabajar por confiar en mi y darme la oportunidad de emprender este proyecto en el laboratorio de Criopreservacion y Hemato Oncologia Molecular del ION

Tambien hacerle llegar mi agradecimiento a mis colegas y amigas del laboratorio Yaribeth Olmedo Angelica Rodriguez y Wendy Franco su colaboracion y asesoramiento ha sido fundamental para la culminacion de este trabajo

A todo el personal del Servicio de Hematologia del Instituto Oncologico Nacional iniciando con la secretaria Diosa con una sonrisa y dispuesta a ayudarte A los medicos hematologos Carlos Rodriguez Jose Franceschi Natalie Buitron y Benito Castillo quienes me ayudaron en todo momento A los auxiliares Iveth Manuel y Magda siempre pendientes de enrolar a los pacientes y transportar las muestras

Por ultimo pero mas importante esto no hubiese sido posible sin el cariño y apoyo incondicional de mi familia A mi madre Yazmina Agudo por enseñarme el valor de la constancia por animarme a seguir luchando pase lo que pase por tus desvelos y consuelos A mi hermano Raul J por ser mi confidente amigo y estar siempre presente A mi hijo Diego Isaac su amor y motivacion en el dia a dia fueron determinantes para el cumplimiento de mis objetivos A mi esposo Ricaurte por tu infinita paciencia apoyo y compania en todos los proyectos que emprendemos juntos

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud

## INDICE GENERAL

RESUMEN	7
SUMMARY	8
I INTRODUCCION	9
1 Leucemia Mieloide Aguda	10
1 1 Epidemiologia y Etiologia	10
1 1 1 Epidemiologia	10
1 1 2 Etiologia	11
1 2 Hematopoyesis y Leucemogenesis	12
1 2 1 Hematopoyesis	12
1 2 2 Leucemogenesis	12
1 3 Clasificacion de la Leucemia Mieloide Aguda	13
1 4 Factores pronosticos de la Leucemia Mieloide Aguda	15
1 4 1 Grupos de riesgo citogenetico en LMA	16
1 4 2 Categorias de genes mutados en LMA	18
1 4 3 Mutaciones de relevancia diagnostica	20
OBJETIVOS	25
METODOLOGIA	26
1 Tipo de estudio	26
2 Universo	26
3 Muestra	26
4 Metodo	26
4 1 Citometria de flujo multiparametrica	26
4 2 Extraccion de ADN Genomico	26
4 3 Determinacion de la concentracion de ADN	26
4 4 Secuenciacion por sintesis de Illumina	27
ANALISIS ESTADISTICO	30
RESULTADOS	31
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	42

RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

## INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

<b>Tabla 1</b>	Clasificación OMS de las Leucemias Mieloide Agudas	14
<b>Tabla 2</b>	Grupos de riesgo citogenético según el MRC 2010	17
<b>Tabla 3</b>	Grupos de Riesgo Genético según ELN 2017	17
<b>Tabla 4</b>	Regiones de genes evaluados por el Panel Trusight Mieloide	27
<b>Tabla 5</b>	Características de los pacientes con LMA	33
<b>Tabla 6</b>	Clasificación de Leucemia Mieloide Aguda según OMS	34
<b>Tabla 7</b>	Grupos de Genes Mutados con LMA	36
<b>Tabla 8</b>	Mutaciones Encontradas en el ION	37
<b>Tabla 9</b>	Frecuencia de gen mutado en pacientes con LMA	38
<b>Grafica 1</b>	Clasificación de LMA en el ION	35

**INDICE DE FIGURAS**

Fig 1 Frotis de Leucemia Mieloide Aguda	10
Fig 2 Distribucion de las mutaciones en la LMA	13
Fig 3 Categorías de Genes Mutados en LMA	19
Fig 4 Localización anómala de NPM1 en la LMA	20
Fig 5 Dominios de FLT3	21
Fig 6 Dominios de CEBPA	22
Fig 7 Isoformas de RUNX1	23
Fig 8 Estructura de ASXL1	24
Fig 9 Evolución Clonal de TP53 en t LMA	24
Fig 10 Citometría de flujo multiparamétrica	35
Fig 11 Secuenciación mediante tecnología Illumina	35



## ABREVIATURAS

- 1 ADN Acido Desoxirribonucleico
- 2 aas aminoacidos
- 3 ASXL1 Additional Sex Combs Like1
- 4 CEBPA subunidad alpha de la proteina de union al potenciador CCAAT
- 5 DNMT3A DNA metiltransferasa 3 alfa
- 6 FLT3 (Fms ligado a tirosina quinasa 3)
- 7 ITD duplicaciones en tandem interno
- 8 NGS Secueciacion de nueva generacion
- 9 NPM1 Nucleoflosmina1
- 10 OMS Organizacion Mundial de la Salud
- 11 PHF6 Homeodominio ligado a dedos de zinc
- 12 PTPN11 proteina tyrosina phosphatasa no receptora tipo11
- 13 PCR Reaccion en Cadena de la Polimerasa
- 14 RAD21 Componente del Complejo de cohesina RAD21
- 15 RUNX1 El gen del Factor de transcripcion relacionado con Runt 1
- 16 TET2 tet methylcytosina dioxygenasa 2
- 17 TKD dominio tirosina cinasa
- 18 TP53 Proteina supresora de tumores p53

## RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad clonal heterogenea caracterizada por mutaciones adquiridas en celulas inmaduras de estirpe mieloide que alteran sus mecanismos normales de auto renovacion proliferacion y diferenciacion celular El proposito de este estudio retrospectivo transversal fue identificar las mutaciones por secuenciacion de nueva generacion (NGS) en muestras de ADN de pacientes referidos al Servicio de Hematologia del Instituto Oncologico Nacional con diagnostico de LMA Las mutaciones mas frecuentes correspondieron a TET2 (64.5%) FLT3 ITD (16.1%) DNMT3A (16.1%) NRAS (16.1%) FLT3 TKD (9.6%) ASXL1 (9.7%) RAD21 (6.4%) NPM1 (6.4%) RUNX1 (6.4%) PTPN11 (6.4%) CEBPA (6.4%) IDH2 (6.4%) ZRSR2 (6.4%) el resto en proporciones menores al 5% La Leucemia Promielocitica Aguda con PML RARA fue el subtipo de LMA mas frecuente (42%) con una mediana de edad de 37 años La heterogeneidad clonal identificada en los subtipos de LMA permitio registrar grupos de riesgo con el proposito de adaptar los tratamientos a cada paciente en particular y detectar asociaciones entre las caracteristicas biologicas del clon tumoral y el comportamiento clinico para discernir mejor la patogenia de la enfermedad

## Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disease characterized by acquired mutations in immature myeloid cells that alter their normal mechanisms of self renewal proliferation and cell differentiation. The purpose of this cross sectional retrospective study was to identify mutations by new generation sequencing (NGS) in DNA samples from patients referred to the Hematology Service of the National Oncology Institute with a diagnosis of AML. The most frequent mutated genes corresponded to TET2 (64.5%), FLT3 ITD (16.1%), DNMT3A (16.1%), NRAS (16.1%), FLT3 TKD (9.6%), ASXL1 (9.7%), RAD21 (6.4%), NPM1 (6.4%), RUNX1 (6.4%), PTPN11 (6.4%), CEBPA (6.4%), IDH2 (6.4%), ZRSR2 (6.4%). Proportions less than 5% were observed in other genes. Acute Promyelocytic Leukemia with PML RARA was the most frequent AML subtype (42%) with a median age of 37 years. Clonal heterogeneity of AML allowed identifying risk groups in order to tailor treatments to individual patients and detect associations between the biological characteristics of the tumor clone and clinical behavior in order to better discern the pathogenesis of the disease.

## INTRODUCCION

## 1. Leucemia Mieloide Aguda

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una neoplasia clonal heterogénea resultado de distintas anomalías genéticas en la línea de estirpe mieloide; que alteran sus mecanismos normales de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular. Surgiendo una considerable complejidad genética (Li *et al.*, 2016). Se produce una acumulación de precursores mieloides inmaduros en médula ósea, con capacidad de replicación, pero sin capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. Estas células tumorales ocupan el espacio medular e impiden una hematopoyesis normal (Fig.1); provocando una insuficiencia medular, por ello es común la recaída y refractariedad de la enfermedad (Döhner *et al.*, 2015).

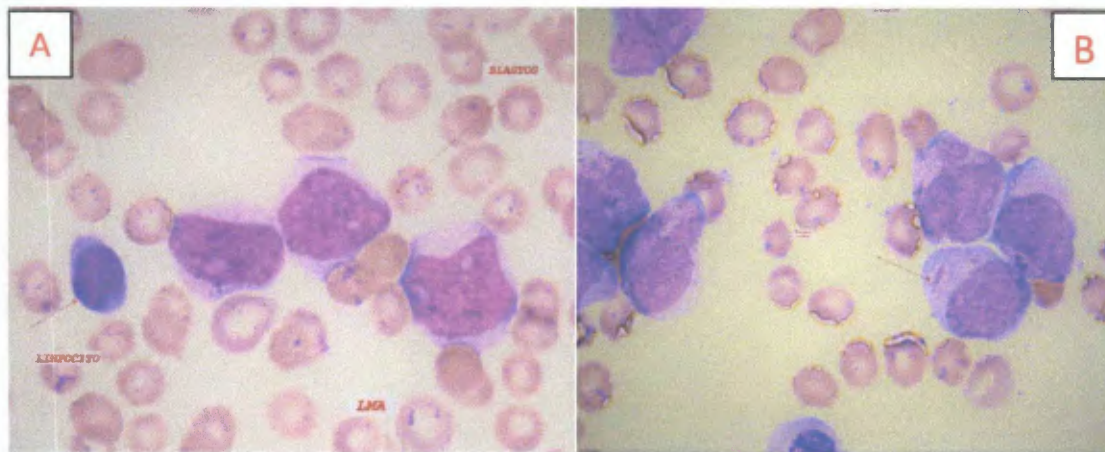


Fig.1 Frotis de Leucemia Mieloide Aguda. Tinción May Grunwald Giemsa. A) Frotis de médula ósea de LMA-M5a, muestra blastos con su núcleo irregular de gran tamaño en relación con el linfocito y 2-3 nucléolos. B) Frotis de médula ósea de una LMA-M3, con mayor granularidad en el citoplasma y bastones de Auer. Fuente: Abrego, 2017.

### 1.1. Epidemiología y Etiología

#### 1.1.1 Epidemiología

En Estados Unidos se presentan 4.2 nuevos casos de LMA por cada 100,000 habitantes, con una tasa de muerte de 2.8% y una sobrevida a 5 años del 26%. La incidencia de la LMA se incrementa con la edad, siendo de 1.3 casos por cada 100,000

habitantes en menores de 65 años y 12.2 casos por cada 100 000 habitantes en mayores de 65 años (Howlader *et al* 2016)

Europa registra una incidencia de LMA en adultos de 5.8 casos por cada 100 000 habitantes incrementándose en mayores de 70 años con una incidencia de 15.25 casos por cada 100 000 habitantes y una tasa de mortalidad en este grupo del 80% (Fey *et al* 2013)

En Latinoamérica al igual que en nuestro país no se cuenta con un registro completo sobre el comportamiento clínico y epidemiológico de la LMA ya que no están clasificadas como leucemias agudas o crónicas y no está documentado el tipo de tratamiento dificultándose la identificación de los grupos y perfiles de riesgo

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer IARC de la Organización mundial de la salud (OMS / World Health Organization WHO) registro en Panamá para el 2012 una incidencia de casos por leucemia del 5.6 y una tasa de mortalidad del 3.8 (Ferlay *et al* 2012)

Según el Registro Nacional del Cáncer de Panamá la atención del cáncer en nuestro país está centralizada debido a la baja disposición de hospitales especializados. El Instituto Oncológico Nacional atiende el 58% de esta población (RNCP MINSA 2015). En el servicio de Hematología de esta institución se registra anualmente un promedio de 12 nuevos casos de LMA.

### 1.1.2 Etiología

La LMA es de etiología desconocida. Solo en un 5% de los casos se puede identificar un factor predisponente. Entre estos están:

- LMA secundaria. A consecuencia de exposición a terapias como son topoisomerasas II, agentes alquilantes o radiación (Sill *et al* 2011)
- Exposición a benceno. Se ha identificado mutaciones de RAS en personas expuestas a benceno como en el humo del cigarrillo que han desarrollado LMA (Snyder 2012)

- LMA familiar Los neoplasmas mieloides con predisposición a línea germinal o malignidad mieloide hereditaria han sido incluidos en la nueva clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) Con ayuda de la secuenciación se han identificado mutaciones germinales envueltas en mecanismos celulares como son CEBPA DDX41 RUNX1 ANKRD26 ETV6 GATA2 SRP72 duplicación genómica 14q32.2 (ATG2B/GSKIP) TP53 (síndrome de Li Fraumeni) mutaciones en línea germinal BRCA1/BRCA2 TERC TERT (disqueratosis congénita) anemia de Fanconi (Churpek *et al* 2016)
- LMA asociada a alteraciones cromosómicas En pacientes con monosomía del 7 trisomía 8 se observa pérdida de GATA2 tienen un riesgo aumentado de transformación leucémica mieloide y poca supervivencia (Hirabayashi *et al* 2017)

## 1.2 Hematopoyesis y Leucemogénesis

### 1.2.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan millones de células a partir de células madres hematopoyéticas (CMHs) capaces de auto renovarse y diferenciarse surgen distintos tipos de células morfológica fenotípica y funcionalmente diferentes Los procesos de auto renovación y diferenciación de las CMHs son controlados por un conjunto de mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos en los nichos hematopoyéticos que se pueden establecer a través de interacciones entre las células (Wilson *et al* 2015)

### 1.2.2 Leucemogénesis

Cuando se dan errores en el ADN de las CMHs o los progenitores celulares durante su replicación puede permitirse la transformación a células leucémicas que son caracterizadas por alteraciones genómicas aberraciones moleculares o alteraciones epigenéticas (Betz 2010)

La secuenciación de nueva generación del genoma y exoma han permitido la identificación de numerosas mutaciones recurrentes en la LMA Parte de estas



mutaciones; encontradas en genes envueltos en la regulación epigenética (Fig.2), como son los genes que regulan la metilación de ADN: DNMT3A (DNA-citosina-5-methyltransferasa 3 alpha), TET2 (Tet methylcytosina dioxigenasa 2), IDH1/2(Isositrato deshidrogenasa 1 / 2), y los genes envueltos en la regulación de histonas: EZH2 (histona-lisina metiltransferasa), ASXL-1 (Additional Sex Combs-Like1). Estas mutaciones producen hipometilación global de ADN, hipermetilación de islas CpG de promotores y patrones alterados de modificación de histonas. El nicho de CMHs participa activamente al proporcionar una lesión de inicio o al responder a la remodelación inducida por la célula leucémica, de esta manera las protege de la muerte celular e impulsa la progresión de la enfermedad. (Sánchez-Aguilera *et al.*, 2017).

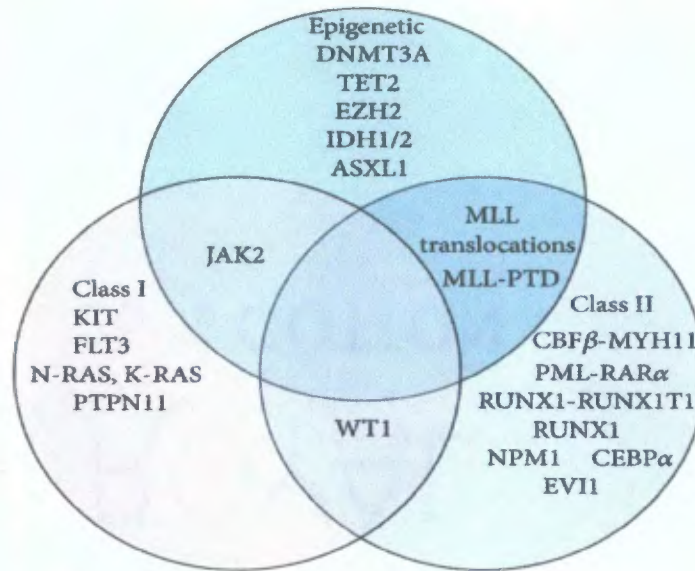


Figura 2. Distribución de las mutaciones en la LMA. Extraído de O'Brien, 2014.

### 1.3 Clasificación de la LMA

En los años 70, el sistema de clasificación de la LMA se basó en la clasificación Franco-Américo-Británica (FAB). Esta clasificación identificaba el equivalente leucémico de las células mieloides atendiendo a criterios morfológicos y citoquímicos. En 2001 la OMS (Organización Mundial de la Salud) introdujo una nueva clasificación, que fue revisada en 2008. Basado en criterios de identificación morfológica de blastos y/o sus equivalentes >20%, criterios clínicos, genéticos y biológicos. (Swerdlow *et al.*, 2008).



En mayo 2016 la OMS publico la actualizacion para la clasificacion de la LMA Incorporando la informacion molecular citogenetica morfologica inmunofenotipica y presentacion clinica (Tabla 1) En esta actualizacion se adicionan a la LMA con anomalias geneticas recurrentes las entidades provisionales LMA con BCR ABL (gen de fusion conocido como cromosoma Filadelfia) mutado y LMA con RUNX1( Factor de transcripcion relacionado con Runt 1) mutado Se mantienen anomalias citogeneticas recurrentes y equilibradas que dan como resultado genes de fusion como RUNX1 RUNX1T1(Factor de transcripcion relacionado con Runt 1/ Factor de transcripcion relacionado con Runt 1 translocado a 1 Runt related transcription factor 1/ Runt related transcription factor 1 translocado a 1) Se cambia el nombre del gen MLL a KMT2A(lisina metil transferasa 2A) Se reconoce que la inversion(inv) del cromosoma 3 o inv(3)(q21 3 q26 2) y la translocacion(t) del cromosoma 3 o t(3 3)( q21 3 q26 2) no representa un gen de fusion sino que reposiciona un potenciador GATA2 distal para activar la expresion de MECOM y confiere haploinsuficiencia de GATA2 Se enfatiza el gen de fusion PML RARA (Leucemia Promielocitica/Receptor Alpha del Acido Retinoico Promyelocytic Leukemia/Retinoic Acid Receptor Alpha) como una entidad y se definen solo las mutaciones bialelicas de CEBPA como un subtipo de LMA

<b>Clasificacion OMS de las Leucemias Mieloide Agudas</b>
<b>LMA con anormalidades geneticas recurrentes</b> LMA con t(8 21)(q22 q22) RUNX1 RUNX1T1 LMA with inv(16)(p13 1q22) or t(16 16)(p13 1 q22) CBFB MYH11 Leucemia Promielocitica Aguda con PML RARA LMA con t(9 11)(p21 3 q23 3) MLLT3 KMT2A LMA con t(6 9)(p23 q34 1) DEK NUP214 LMA con inv(3)(q21 3q26 2) o t(3 3)(q21 3 q26 2) GATA2 MECOM(EVI1) LMA (megacarioblastica) con t(1 22)(p13 3 q13 3) RBM15 MKL1 Entidad Provisional LMA con mutaciones en BCR ABL1 LMA con mutaciones en NPM1 LMA con mutacion bialelica de CEBPA Entidad Provisional LMA con mutacion en RUNX1
<b>LMA con cambios relacionados a mielodisplasia</b>
<b>LMA relacionada con terapia (t LMA)</b>
<b>LMA no especificada de otro modo</b> LMA minimamente diferenciada LMA sin maduracion LMA con maduracion Leucemia aguda mielomonocitica Leucemia aguda monoblastica o monocitica

Leucemia eritroide pura Leucemia aguda megacarioblastica Leucemia aguda basofílica Panmielosis aguda con mielofibrosis
<b>Sarcoma mieloide</b>
<b>Proliferación mieloide relacionada con Síndrome de Down</b> Mielopoyesis anormal transitoria LMA/SMD relacionada con el síndrome de Down
<b>Neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas</b>

Tabla 1 Clasificación OMS de las Leucemias Mieloide Agudas Adaptado de Arber *et al* 2016

En la LMA con cambios relacionados con mielodisplasia se definen las anormalidades citogenéticas cuando haya la presencia de  $\geq 20\%$  blastos y la terapia previa sea excluida. La LMA no especificada de otro modo se mantiene con un cambio solo la leucemia eritroide pura es reconocida como una leucemia eritroide aguda.

#### 1.4 Factores pronósticos para la LMA

El pronóstico de los pacientes con LMA está condicionado por factores tales como

- Edad avanzada: En pacientes mayores de 60 años la tasa de respuesta completa es de 45-50% y la supervivencia global es menor del 15% (Shah *et al* 2013). Existe la hipótesis de que con la edad el genoma se vuelve inestable y los telómeros se acortan, por tanto se crea una diversidad clonal e inestabilidad genética de la enfermedad.
- Comorbilidad: Condiciones debilitantes o enfermedades asociadas que si están presentes influyen de una forma concreta en una mala tolerancia al tratamiento y baja esperanza de vida del sujeto (Walter *et al* 2011).
- LMA secundaria: aquellos pacientes con LMA posterior a una mielodisplasia o expuestos a quimioterapia antineoplásica presentan una menor tasa de respuesta completa (Hulegårdh *et al* 2015).
- Recuento leucocitario: Pacientes con recuento leucocitario mayor a 100 000 tienen alto riesgo de complicaciones durante la terapia de inducción y compromiso del sistema nervioso central (Estey 2014).

- e) Enfermedad residual mínima (ERM) Se ha visto un pronóstico adverso cuando hay persistencia de células leucémicas post inducción al tratamiento (Yin *et al* 2014)
- f) Citogenética Las anomalías citogenéticas en LMA son importantes predictores independientes de respuesta y supervivencia. Pese a algunas discrepancias en la clasificación, los investigadores identificaron 3 grupos de riesgo (favorable, intermedio y adverso) con distinta probabilidad de recaída y de supervivencia en función de los hallazgos del cariotipo.
- g) Alteraciones moleculares Las nuevas técnicas genómicas proveen un vistazo de la frecuencia y el espectro de las mutaciones, sus patrones de cooperativismo y exclusividad mutua, al igual que la regulación epigenética de la enfermedad.

#### 1.4.1 Grupos de riesgo citogenético

El análisis citogenético permite la detección de un 55% de las anomalías cromosómicas en LMA. Esta herramienta llevó a un panel de expertos a proporcionar recomendaciones y clasificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo en base a su diagnóstico, evaluación de respuesta y resultado del tratamiento quimioterapéutico.

El grupo de riesgo favorable representa el 25% de los pacientes. Incluye las alteraciones t(8 21) e inv(16) o t(16 16). Presente en LMA de novo asociadas a tasas de remisión completa de alrededor del 90% y a una supervivencia global (SG) a los 5 años del 65%. Se han encontrado anomalías cromosómicas asociadas como deleciones en 9q, trisomía del 8 (+8), trisomía del 22 (+22) y pérdida de un cromosoma sexual (X Y) (Hoyos *et al* 2013).

El grupo de riesgo intermedio (45-60%) incluye a los pacientes con cariotipo normal junto con las alteraciones que no pueden incluirse en los grupos de riesgo favorable o adverso.

El grupo de pacientes con pronóstico adverso (5-14%) lo definen como cariotipo complejo de  $\geq 3$  alteraciones, en su mayoría alteraciones no balanceadas. Este grupo muestra una tasa elevada de resistencia al tratamiento de inducción, alta

probabilidad de recidiva y corta supervivencia. El cariotipo monosomal en pacientes con LMA en muchos estudios ha demostrado también una respuesta pobre al tratamiento (Yanada *et al.*, 2012).

Grupo pronóstico	Alteraciones citogenéticas
<b>Favorable</b>	t(8;21); inv(16)
<b>Intermedio</b>	Entidades no clasificadas como favorable o adverso
<b>Adverso</b>	Add (5q), -5, del(5q), -7, add (7q)/del(7q), abn(3q), inv (3)/t(3;3), 20q, 21q, -17, abn(17p), t(6;9), t(9;22), t(6;11), t(11q23), cariotipos complejos con $\geq 4$ anomalías no relacionadas

Tabla 2 Grupos de riesgo citogenético según el MRC 2010 (Grimwade *et al.*, 2010).

La ELN (European Leukemia Net por sus siglas en inglés) recomendó una nueva clasificación de grupos de riesgo genético de acuerdo a las alteraciones moleculares reconocidas en la actualización de la clasificación OMS (Tabla 3). De esta manera se busca correlacionar el riesgo citogenético y molecular con los datos clínicos; ayudando a decidir la terapia a seguir, como el trasplante hematopoyético post-remisión (posterior a la disminución o desaparición de signos y síntomas de enfermedad) cuando sea el caso.

Grupo genético	Subtipos
<b>Favorable</b>	t(8,21)(q22,q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) o t(16,16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1 mutado in FLT3-ITD FLT3-ITD BAJO CEBPA mutación bialélica
<b>Intermedio</b>	NPM1 mutado y FLT3-ITD <sup>(bajo)</sup> NPM1 no mutado sin FLT3-ITD/FLT3-ITD bajo (sin alt. genéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o desfavorables
<b>Adverso</b>	inv(3)(q21.3;q26.2); t(3,3)(q21.3;q26.2); G4142, MECOM t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v,11)(v,q23.3); KMT2A (MLL) reordenado t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 -5 o del(5q), -7, -17/abn(17p), cariotipo complejo, cariotipo monosomal NPM1 no mutado y FLT3-ITD <sup>(bajo)</sup> RUNX1 mutado ASXL1 mutado TP53 mutado

Tabla 3. Grupos de Riesgo Genético, según ELN 2017.

#### 1.4.2 Categorías de Genes Mutados

La Red de Investigación del Genoma de Cáncer (The Cancer Genome Atlas Research Network TCGARN) en 2013 demostró con la técnica de secuenciación de nueva generación que la mayoría de los casos de LMA de novo se caracterizan por la heterogeneidad clonal con la presencia de un clon fundador (conductor) y al menos un subclon (pasajero). Estos genes significativamente mutados fueron organizados en 9 categorías funcionales (fig 3). Estas categorías son:

1. Genes de señalización de receptores tirosina cinasa de clase III como FLT3 (59% de los casos) confieren una ventaja proliferativa a través de la vía de señalización RAS RAF JAK STAT y PI3K AKT.
2. Genes de factores de transcripción mielóide (22% de los casos). Tipo RUNX1 provocan desregulación de la transcripción y diferenciación hematopoyética.
3. Reordenamientos que fusionan factores de transcripción (18% de los casos) tales como RUNX1 RUNX1T1 PML RARA MYH11 CBFβ provocan desregulación de la transcripción y diferenciación hematopoyética (Madan *et al* 2016).
4. Gen de la nucleofosmina (NPM1) (27% de los casos) codifica una proteína chaperona nucleocitoplasmática multifuncional. Sus mutaciones dan como resultado una localización citoplasmática aberrante tanto de NPM1 como de las proteínas que interactúan con ella.
5. Genes del spliceosoma (14% de los casos) como SRSF2 SF3B1 U2AF1 y ZRSR2. Sus mutaciones están involucrados en la desregulación del procesamiento del ARN.
6. Genes del complejo de la cohesina (13% de los casos) como STAG2 y RAD21 cuyas mutaciones ponen en peligro la segregación cromosómica precisa y la regulación transcripcional.
7. Genes modificadores de cromatina (30% de los casos) tales como ASXL1 y EZH2 que al mutar provocan desregulación de la modificación de la cromatina (por ejemplo metilación de histonas H3 y H2A en los residuos de lisina K79 K27 y K119 respectivamente) así como fusión de genes KMT2A MLLT3 que pueden alterar otras metiltransferasas como DOT1L (DOT1 like similar a la histona metiltransferasa H3K79).



8. Genes relacionados a metilación de ADN: (44% de los casos) DNMT3A y TET2, así como IDH1 e IDH2, cuyas mutaciones, al producir el oncometabolito 2-hidroxi- glutarato (2HG), pueden desregular la metilación de ADN. (hmC: 5-hydroxymethylcytosine, mC: 5-methylcytosine) (Akalin *et al.*, 2012).
9. Genes supresores de tumores: (16% de los casos) tales como TP53, WT1 y PHF6, cuyas mutaciones desregulan la transcripción y alteran la degradación a través de los homólogos de MDM2 y PTEN murinos.

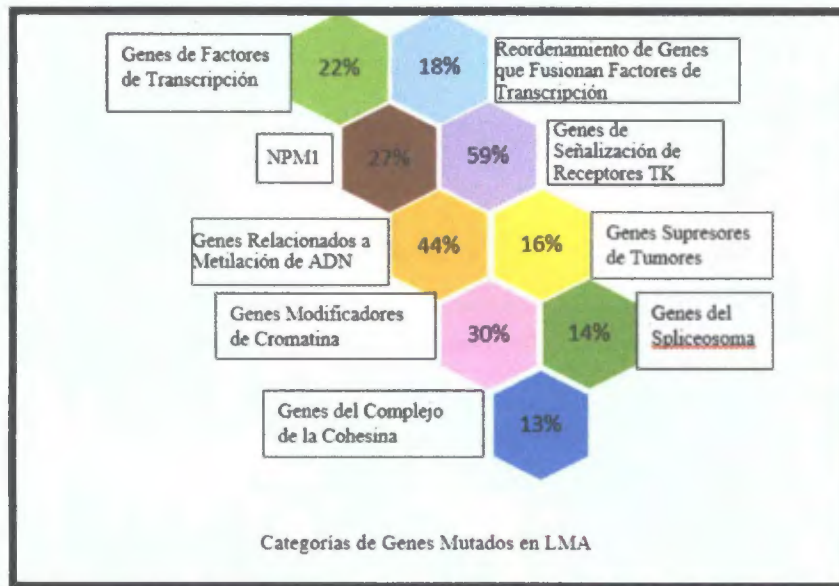


Fig.3 9 Categorías de Genes Mutados en LMA. Adaptado de TCGARN, 2013.

#### 1.4.3 Mutaciones de relevancia diagnóstica.

La gran cantidad de información genómica que produce la tecnología de secuenciación masiva mediante paneles permite reducir drásticamente los tiempos de respuesta, frente a los esquemas de análisis de genes que se aplican en los laboratorios moleculares, posibilitando la detección de clones emergentes que definen categoría de enfermedad (NPM1, CEBPA y RUNX1), detectar mutaciones pronósticas y/o que se benefician con terapia que inhibe la tirosin quinasa (FLT3-ITD y FLT3-TKD), y la detección de mutaciones asociadas con mal pronóstico (TP53 y ASXL1).

**a) NPM1 (Nucleoflosmina1):** localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35). El gen NPM1 codifica para una fosfoproteína nucleolar de 294 aminoácidos. Es una chaperona que transporta partículas pre-ribosomales a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma. También puede jugar un papel en el control del ciclo celular y en la regulación de la duplicación del centrómero para facilitar la mitosis ordenada. Se han identificado más de 26 mutaciones diferentes en pacientes con LMA que consisten en inserciones/deleciones cortas (entre 4 y 10 pb) en las posiciones 863 a 878 en el exón 12 del gen; que conducen a un cambio en el marco de lectura provocando diferentes proteínas que difieren en la porción C terminal, alterando la localización nuclear y permitiendo la acumulación aberrante de la proteína en el citoplasma (Fig.4). Dichas mutaciones son frecuentes en la LMA citogenéticamente normal (27% de los casos); Y asociado con otras mutaciones como FLT3 – ITD, mutaciones en DNMT3A, IDH1, IDH2 y TET2 (Port *et al.*, 2014).

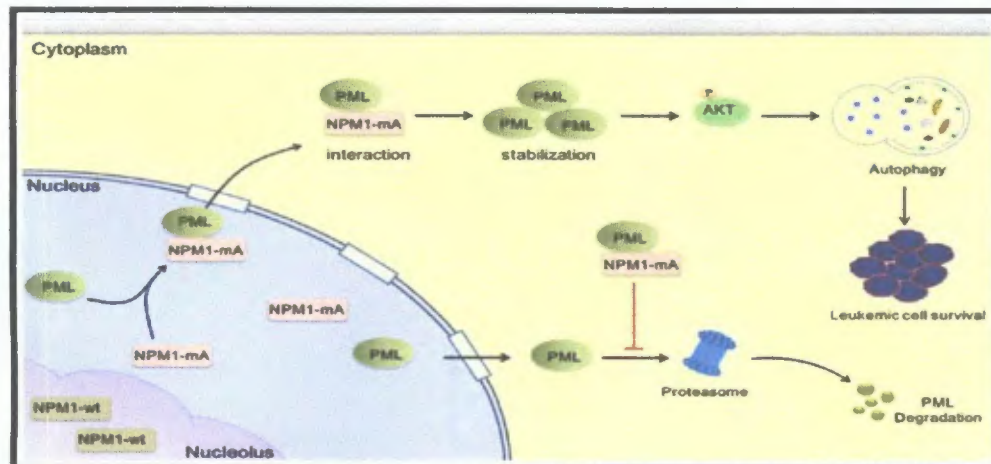


Fig. 4 Localización anómala de NPM1 en la LMA. NPM1 media la deslocalización de partículas al citoplasma y mejora la estabilidad de las células leucémicas. Tomada de Zou *et al.*, 2017.

**b) FLT3 :** El gen FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3); localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12.2). Codifica una proteína de 993 aminoácidos; con 24 exones, que se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas e interviene en su proliferación y diferenciación. La proteína FLT3 está compuesta por una región



extracelular con cinco dominios, semejantes a las inmunoglobulinas, una secuencia transmembrana y una porción intracelular conformada por un segmento yuxtamembrana (JM) seguido de un dominio tirosina cinasa (TKD) (Fig.5). En estos últimos dominios se han identificado las mutaciones de LMA. Las mutaciones puntuales en el dominio tirosina cinasa (TKD) se detectan entre 5 -10% de pacientes. En la mayoría de los casos estas mutaciones resultan de la sustitución de un aspartato por una tirosina en el codón 835 (D835Y) o por Isoleucina en el codón 836 (I836). Las duplicaciones en tandem interno (ITD) se detectan en el 20%-25% de pacientes, en general con un papel pronóstico adverso. Resulta de la duplicación de un fragmento dentro de la región del dominio yuxtamembrana codificado por los exones 14 y 15 de FLT3, que puede variar entre 3-400 pb. Las ITDs activan en forma constitutiva al receptor de FLT3, lo que promueve la activación de diferentes vías de transducción y señalización, como: fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, MAPK/ERK y (JAK2)STAT5. (Janke *et al.*, 2014).

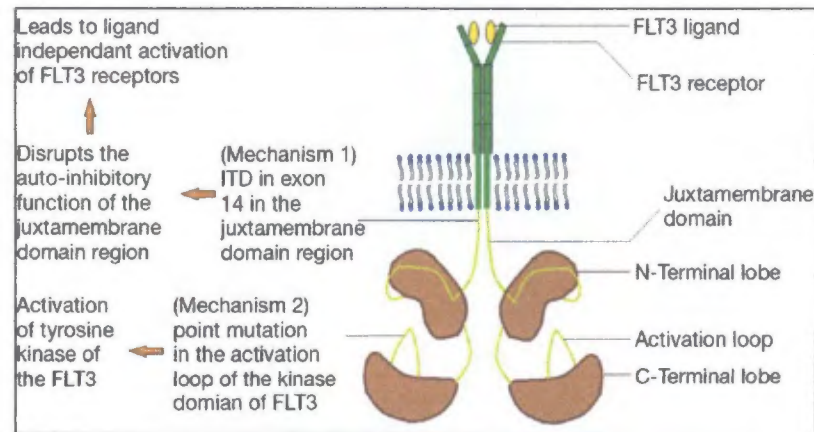


Fig. 5 Dominios de FLT3. FLT3 está compuesta por una región extracelular, una secuencia transmembrana y una porción intracelular conformada por un segmento yuxtamembrana (JM) seguido de un dominio tirosina cinasa (TKD). Adaptado de Pawar et al., 2014.

- c) **CEBPA**: subunidad alpha de la proteína de unión al potenciador CCAAT. Se encuentra en el cromosoma 19q13.1. Codifica una proteína de 358 aminoácidos. Tiene 2 isoformas: la proteína nativa de 42 kD y una proteína truncada de 30 kD (carece de región N-terminal). La proteína de 42 kD está formada por una región N-terminal que consta de dos dominios de transactivación (TAD1 y TAD2); la región



C-terminal formada por un dominio básico de cierre de leucina (bZIP) que se encarga de la homodimerización de CEBPA, heterodimerización con otros miembros de la familia CEBP (Fig.6). Siendo un factor de transcripción hematopoyético, juega un rol importante en la proliferación y diferenciación de precursores mieloides; su mutación resulta en un bloqueo de la diferenciación. Las mutaciones en CEBPA se han descrito en LMA de cariotipo normal, encontrándose en 7 - 11% de los casos. La mayoría de las mutaciones en CEBPA se caracterizan por la combinación de una mutación en la región N-terminal (principalmente inserciones/delecciones) que provocan un cambio en el marco de lectura, lo que se traduce en una sobreexpresión de la proteína de 30 kD; y otra mutación en la región Bzip, cada una en un alelo diferente. Dichas mutaciones bialélicas confieren un pronóstico favorable a los pacientes portadores, siempre que no se acompañe de una mutación de FLT3-ITD. También se han encontrado mutaciones heterocigotas de CEBPA asociado a mutaciones de NPM1, FLT3-ITD y MLL-PTD con pronóstico adverso (Taskesen *et al.*, 2011).

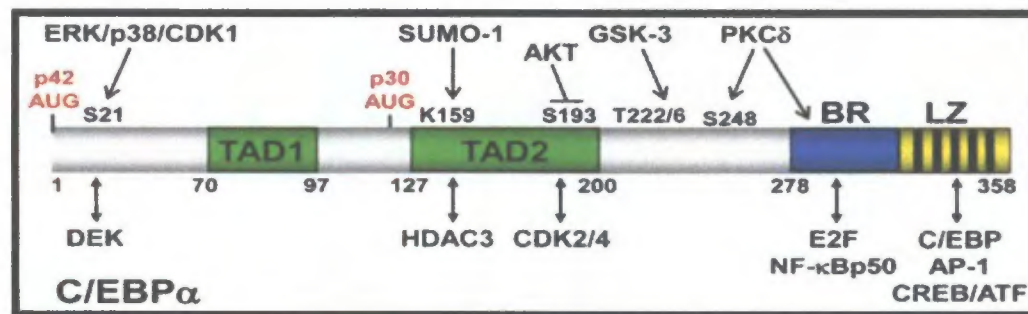
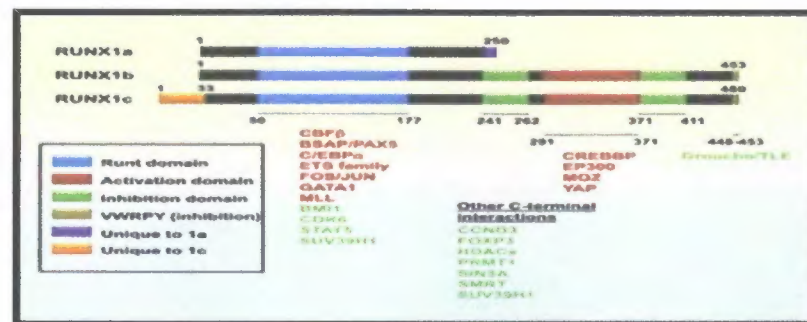


Fig.6 Dominios de CEBPA. Tomado de Friedman, 2015. Se muestran los dominios de transactivación y bZIP.

- d) **RUNX1:** El gen del Factor de transcripción relacionado con Runt 1 (Runt Related Transcription Factor 1) se localiza en el cromosoma 21q22. Codifica para el factor de transcripción RUNX1, también llamado CBF-Alpha-2 (CBFα). Aunque existen al menos 12 isoformas, las 3 principales isoformas contienen el dominio Runt situado en la región N-terminal. RUNX1a (250 a.a) y RUNX1b (453 a.a), son el resultado de

splicing alternativo, compartiendo la misma región N-terminal. RUNX1a carece de los dominios reguladores transcripcionales presentes en la región C-terminal común en las otras dos isoformas RUNX1. RUNX1c (480 a.a) es la más larga de las isoformas RUNX1 y su transcrito se transcribe a partir de un promotor distal en el locus RUNX1, mientras que RUNX1a y RUNX1b se transcriben a partir del promotor proximal. RUNX1b y RUNX1c tienen la misma región C-terminal. El dominio de Runt media la unión al ADN y la interacción con su socio de heterodimerización, el factor de unión al núcleo beta (CBF $\beta$ ), que por sí mismo no se une al ADN. El factor CBF es esencial para una adecuada hematopoyesis Fig.7. Las mutaciones en RUNX1 se han descrito casi exclusivamente en LMA con anomalías genéticas recurrentes, encontrándose en 10% de los casos. Frecuentemente implicando mutaciones en modificadores epigenéticos, componentes del complejo del spliceosoma y del complejo de las cohesinas. Sus mutaciones se han asociado con avanzada edad y pobre pronóstico (15.1% casos en  $\geq 60$  años) (Gaidzik *et al.*, 2016).



12(Fig.8). Se han descrito en LMA con cambios relacionados con mielodisplasia; encontrándose en 26.21% de los casos, asociados a pronóstico adverso. (Devillier, R. et al, 2015).

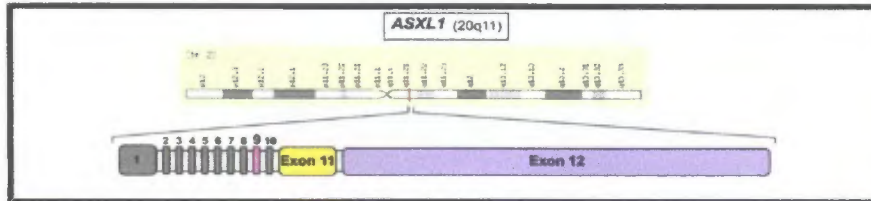


Fig.8 Estructura de ASXL1. Adaptada de Gelsi-Boyer *et al.*, 2012..

- f) **TP53(Proteína supresora de tumores p53):** El gen TP53 se localiza en el cromosoma 17p13.1 y codifica para un factor de transcripción nuclear de 393a.a y 3 dominios: un dominio de activación de factores de transcripción; un dominio que reconoce la secuencia específica del ADN (dominio central), donde se dan la mayoría de las mutaciones y un dominio carboxi terminal. Dentro de las funciones de TP53 están la detención del ciclo celular para evitar replicación de ADN dañado, activación de las enzimas de reparación del ADN, entrada en senescencia (parada permanente del ciclo celular) y activación de la apoptosis para evitar la proliferación de células con ADN anormal. Se ha demostrado que las mutaciones TP53 en clones de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de adultos mayores con un cáncer primario son resistentes a la quimioterapia y evolucionan a t-AML (Fi.9). Se relacionan principalmente con LMA de cariotipo complejo (28.2%) y riesgo citogenético desfavorable.

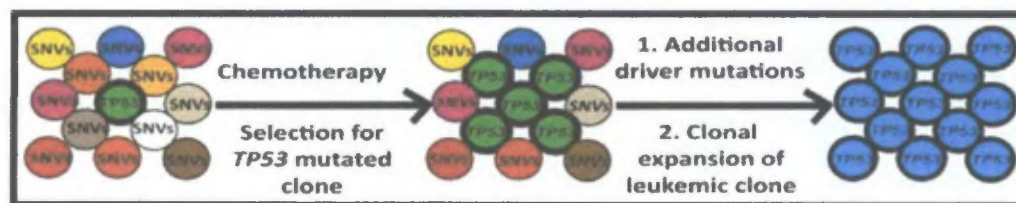


Fig.9 Evolución Clonal de TP53 en t-LMA. Tomado de Wong *et al.*, 2015.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

1 Determinar la frecuencia de mutaciones en genes asociados a LMA en muestras de medula osea y/o sangre periferica de pacientes atendidos en el ION por la tecnica de secuenciacion de nueva generacion (NGS) desde enero de 2015 hasta diciembre de 2016

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1 Identificar las mutaciones en genes asociados a LMA de pacientes atendidos en el ION por la tecnica de secuenciacion de nueva generacion (NGS)
- 2 Calcular las frecuencias de los genes mutados asociados a LMA
- 3 Calcular las frecuencias de mutaciones en los genes estudiados
- 4 Comparar las frecuencias de mutaciones y genes mutados con otros estudios



## **METODOLOGIA**

**1 Tipo de estudio** descriptivo retrospectivo

**2 Universo** Estudio retrospectivo de corte transversal con muestreo no probabilístico de tipo conveniente. Se analizaron 31 muestras de pacientes con diagnóstico reciente de LMA remitidos de diferentes centros de salud del país al Servicio de Hematología del Instituto Oncológico Nacional entre enero de 2015 y diciembre de 2016.

**3 Muestras** Se seleccionaron un total de 31 muestras de médula ósea y/o sangre periférica de las cuales 17 eran del sexo femenino y 14 masculino, todos mayores de 15 años. Todas las muestras cumplían con los criterios de inclusión establecidos en este estudio.

### **4 Metodo**

#### **4.1 Citometría de flujo multiparamétrica**

La técnica de citometría de flujo multiparamétrica fue utilizada para la detección de LMA y la identificación del subtipo de LMA en las muestras de médula ósea y/o sangre periférica. Estas muestras se tomaron como parte del diagnóstico y seguimiento rutinario del Servicio de Hematología del Instituto Oncológico Nacional. Otros análisis que forman parte del diagnóstico son PCR en tiempo real para detección de las proteínas de fusión BCR ABL, PML RAR $\alpha$ , RUNX1 RUNX1T1, CBFB MYH1, AF4 MLL (KMT2A), FISH (Hibridación fluorescente in situ). Las pruebas citogenéticas (cariotipo) se realizan en un laboratorio externo, cuya muestra es embalada y enviada.

#### **4.2 Extracción de ADN Genómico**

Para la extracción del DNA se utilizó el kit comercial QIAAmp® DNA Mini kit (Qiagen 2016) basado en el principio de separación de lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.

#### **4.3 Determinación de la concentración de ADN**

Las mediciones de absorbancia se hicieron a una longitud de onda entre 260nm y 280nm (espectrofotómetro Epoch). La integridad del ADN fue medida por electroforesis capilar.

(Fragment Analyzer) La presencia de una banda refleja la existencia en la muestra de ADN de alto peso molecular

#### 4.4 Secuenciación por síntesis de Illumina

Se incluyó en cada reacción de secuenciación un control positivo y un control de amplificación

**Control de amplificación** Se utilizó para confirmar que la librería fue exitosamente amplificada se utilizaron 5 µl de cada muestra como positivo de amplificación el cual debió generar un producto de 350 pb y 5 µl de H<sub>2</sub>O de grado molecular como control negativo la cual no generó producto

Se secuenciaron regiones asociadas a LMA en 54 genes con el propósito de identificar las mutaciones presentes Se incluyó la región codificante completa de 15 genes y hotspots en 39 genes Se generó un total de 568 amplicones (rango de longitud 225-275 pb)

<b>Tabla #4 REGIONES (EXONES) DE GENES EVALUADAS POR PANEL TRUSIGHT MIELOIDE</b>			
ABL1	4-6	JAK3	13
ASXL1	12	KDM6A	completo
ATRX	8-10 y 17-31	KIT	2-8-11-13+17
BCOR	completo	KRAS	2+3
BCORL1	completo	MLL	5-8
BRAF	15	MPL	10
CALR	9	MYD88	3-5
CBL	8+9	NOTCH1	26-28+34
CBLB	9-10	NPM1	12
CBLC	9-10	NRAS	2+3
CDKN2A	completo	PDGFRA	12-14-18
CEBPA	completo	PHF6	completo
CSF3R	14-17	PTEN	5+7
CUX1	completo	PTPN11	3+13
DNMT3A	completo	RAD21	completo
ETV6/TEL	completo	RUNX1	completo
EZH2	completo	SETBP1	4 (parcial)
FBXW7	9+10+11	SF3B1	13-16
FLT3	14+15+20	SMC1A	2-11-16+17
GATA1	2	SMC3	10-13-19-23-25+28
GATA2	2-6	SRSF2	1
GNAS	8+9	STAG2	completo
HRAS	2+3	TET2	3-11
IDH1	4	TP53	2-11
IDH2	4	U2AF1	2+6
IKZF1	completo	WT1	7+9
JAK2	12+14	ZRSR2	completo

El protocolo TruSight Myeloid de Illumina se ha optimizado para 50 ng de gADN total. Por lo cual las muestras de ADN son previamente ajustadas a una concentración de 5ng/μl.

La secuenciación mediante la tecnología Illumina consta de 4 etapas: Preparación de muestras, generación de grupos, secuenciación por síntesis y análisis de datos.

#### Preparación de la muestra

A partir de un paso de fragmentación mediante el uso de una enzima transposasa que fragmenta el ADN y simultáneamente agrega adaptadores (oligos) específicos a ambos extremos de los fragmentos. Las condiciones de hibridación son 1 min a 95°C. Desnaturalización: luego baja gradualmente a 40°C. Hibridación. Este cambio gradual de temperatura normalmente dura 80 minutos (Head S R et al 2014). Se hicieron lavados para eliminar los adaptadores no unidos. Posteriormente se adiciona en cada pocillo la master mix (ELM4) y se incuba por 45 min a 37°C. En este proceso una ADN polimerasa se extiende desde el oligo upstream a través de la región de interés, seguido de una ligación en el extremo 5' del oligo downstream utilizando una ADN ligasa. Hacemos una elución con NaOH 50mM.

#### Generación de grupos

En este paso los productos eluidos de la extensión – ligación son amplificados usando cebadores que añaden a la muestra secuencias índices (i5 y i7) así como también adaptadores comunes (P5 y P7) y la mezcla de Truseq DNA polimerasa / master mix 2 PCR que se requieren para la generación de aglomerados (clusters) con un tamaño del amplicon de aproximadamente 385 768pb. Las condiciones de amplificación son 95°C por 2 minutos, seguido de (95°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos) se repite hasta completar 27 ciclos, por último 72°C por 5 minutos, mantener a 10°C o almacenar en nevera de 2°C a 8°C durante dos días. Se procedió a limpiar la librería. Este paso usa perlas AMPure XP para purificar los productos de PCR de otros componentes de la reacción. Se hicieron lavados con etanol al 80% y elución con tampón TRIS. Si almacena el plato en refrigeración, reemplace el adhesivo por uno nuevo.

Previo a la secuenciación se normaliza la cantidad de cada librería para asegurar una igualdad en el pool de muestras de la librería. Con ayuda de aditivos de normalización (LNA1 LNS2 LNW1) se hacen lavados y se eluye con NaOH 0.1N. Para la preparación de la secuenciación se combinan volúmenes iguales de la librería normalizada la cual es diluida en tampón de hibridación y desnaturalizada a 96°C antes de cargar el cartucho de reacción Miseq v3 en el secuenciador (Miseq Illumina). El pool de librería ya final consiste en ADN de una sola hebra.

#### Secuenciación por síntesis de Illumina

Utiliza cuatro dNTPs terminadores reversibles cada uno marcado con un fluoróforo diferente. Estos terminadores son ligados a los nucleótidos y bloquean la polimerización por lo que la polimerasa solo puede añadir una base a cada cadena de DNA que se está sintetizando. Después de cada ciclo de incorporación se eliminan los terminadores se determina la identidad de la base insertada por la excitación inducida por láser de los fluoróforos y la formación de imágenes que se registran.

#### Análisis de datos

Una vez se ha supervisado las métricas de calidad de la corrida (% Q>30 Densidad de grupos de 1200 – 1400 K/mm<sup>2</sup> % de clusters que pasan el filtro Rendimiento estimado % Fase por debajo de 0.4 Cobertura de cada muestra) se transfieren automáticamente los datos de secuenciación usando como genoma de referencia Homo Sapiens / UCSC / hg19 / Sequence / Whole Genome FASTA del programa Miseq Control Software al programa Variant Studio v2.1.46. Este programa usa la plataforma de almacenamiento y análisis genómico Base Space basada en la nube que se integra directamente con todos los secuenciadores Illumina permitiendo comparar las secuencias obtenidas con la base de datos de las siguientes fuentes:

- Variant Effect Predictor (VEP)
- 1000 Genomes Project
- Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC)
- ClinVar



- Centro Nacional de Biotecnología (NCBI)
- Servidor Variant Exome del Instituto Nacional del Corazón los Pulmones y la Sangre (NHLBI)
- Universidad de California Santa Cruz Genome Browser (UCS)

Las alteraciones que se pueden detectar son variantes de un nucleótido (single nucleotide variants SNV) pequeñas inserciones y deleciones (indels) y variaciones en el número de copias (copy number variations CNVs)

### **Análisis estadístico**

La relación entre variables clínicas (edad sexo diagnóstico OMS porcentaje de blastos niveles de hemoglobina plaquetas y leucocitos y la presencia de mutaciones se realizó con tablas de contingencia

La frecuencia de genes de LMA mutados en la población fue determinada por conteo directo (presencia del gen mutado/el número de individuos estudiados x 100)

## RESULTADOS

Se identificaron mutaciones en todos los pacientes objeto de estudio

### Características de los pacientes con LMA

Las principales características clínicas y biológicas de los 31 pacientes incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 5. La serie estaba compuesta por 14 hombres y 17 mujeres con una mediana de edad de 40 años (rango 17 – 68 años) siendo el 84% de los pacientes menores de 60 años. La mediana de leucocitos fue de  $45 \times 10^9/L$  (rango 0.65 – 307.21) la de hemoglobina de 8.71 g/dL (rango 4.3 – 15 g/dL) la de plaquetas de  $73 \times 10^9/L$  (rango 7 – 348) y la de blastos 60% (rango 20-94).

En la tabla 6 se muestran los subtipos de LMA para cada paciente utilizando el equipo FACSAria II que mostramos en la figura 10. Identificamos 3 pacientes con LMA M0, 5 LMA M1, 2 LMA M2, 13 LMA M3 o LPA con el rearrreglo PML-RAR $\alpha$ , 3 LMA M5a, 2 LMA secundaria a tratamiento quimioterapéutico, 1 LMA con inv(16), 1 LMA con t(8;21), 1 LMA con t(6;9). De acuerdo a la clasificación OMS que presentamos en la Gráfica 1, el 52% de los pacientes posee LMA con anomalías genéticas recurrentes, 42% LMA no especificado de otra manera, 6% LMA 2a a tratamiento con quimioterapia.

### Grupos de Genes Mutados en LMA

En la tabla 7 encontramos la frecuencia de genes mutados por grupos funcionales usando el equipo Miseq de Illumina que mostramos en la figura 11. Genes relacionados a metilación de ADN (93.5%), Señalización activada (61.3%), Modificadores de cromatina (22.6%), Factores de Transcripción (19.3%), Cohesina (9.7%), Spliceosoma (9.7%), Supresores de tumores (6.4%), NPM1 (6.4%).

### Mutaciones en genes con LMA

Se detectó al menos una alteración en el 100% de los pacientes (n = 31). 22/31 pacientes mostraron más de un gen mutado. Se detectaron 71 genes mutados con un promedio de 2 genes mutados por paciente (rango 1-5). En la tabla 8 se muestra las alteraciones encontradas para cada gen. Se detectaron 2 alteraciones en un mismo gen en 11 de los 71

genes mutados La tabla 9 muestra las mutaciones mas frecuentes las cuales correspondieron a TET2 (64 5%) FLT3 (25 8%) DNMT3A (16 1%) NRAS (16 1%) ASXL1 (9 7%) RAD21 (6 4%) NPM1 (6 4%) RUNX1 (6 4%) CEBPA (6 4%) IDH2 (6 4%) ZRSR2 (6 4%) el resto en proporciones menores al 5%

Mutaciones de relevancia diagnostica en LMA

Las anormalidades geneticas de relevancia diagnostica encontradas en este estudio son

Mutaciones en Genes de señalizacion de receptores de tirosin quinasa tipo FLT3 ITD

FLT3 TKD NRAS PTPN11 CBL KIT CSF3R

Supresores de tumores WT1

Factores de transcripcion tipo CEBPA GATA2

- NPM1

Modificadores de cromatina tipo CDKN2A

Genes relacionados con Metilacion de ADN tipo DNMT3A IDH2

Tabla 5. Características de los pacientes con LMA.

Característica	Paciente (N=31)
Total	
Edad años (rango)	17-68
≥ 60	5
< 60	26
Sexo	
Hombre	14
Mujer	17
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	
Mediana	45
Rango	0.65 – 307.21
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	
Mediana	73
Rango	7 – 348
Hemoglobina (g/dL)	
Mediana	8.71
Rango	4.3 - 15
% Blasto SP	
Mediana	60
Rango	20-94

TABLA 6. CLASIFICACION DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA SEGÚN OMS.

# CASO	SUBTIPO de LMA	CLASIFICACION OMS
001	LMA -M1	LMA no especificada de otro modo
002	LMA -M1	LMA no especificada de otro modo
003	LMA -M1	LMA no especificada de otro modo
004	LMA -M0	LMA no especificada de otro modo
005	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
006	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
007	LMA -M0	LMA no especificada de otro modo
008	LMA -M0	LMA no especificada de otro modo
009	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
010	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
011	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
012	LMA relacionada con terapia (t-LMA)	LMA relacionada con terapia (t-LMA)
013	LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
014	LMA -M1	LMA no especificada de otro modo
015	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
016	LMA M5a	LMA no especificada de otro modo
017	LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
018	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
019	LMA M5a	LMA no especificada de otro modo
020	LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
021	LMA -M1	LMA no especificada de otro modo
022	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
023	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
024	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
025	LMA relacionada con terapia (t-LMA)	LMA relacionada con terapia (t-LMA)
026	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
027	LMA -M2	LMA no especificada de otro modo
028	LMA -M5a	LMA no especificada de otro modo
029	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes
030	LMA -M2	LMA no especificada de otro modo
031	LPA con PML-RARA	LMA con anormalidades genéticas recurrentes

LMA-M0 Leucemia Mieloide Aguda subtipo M0, LMA-M1 Leucemia Mieloide Aguda subtipo M1, LMA-M2

Leucemia Mieloide Aguda subtipo M2, LPA con PML-RARA Leucemia Promielocítica Aguda M3-PML-RARA, t-LMA Leucemia Mieloide Aguda Secundaria a tratamiento de Quimioterapia, Leucemia Mieloide Aguda subtipo M5a, LMA con t(6;9)(p23;q34.1) Leucemia Mieloide Aguda con translocación (6;9)(p23;q34.1), LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 Leucemia Mieloide Aguda con translocación (8;21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Leucemia Mieloide Aguda con inversión (16)(p13.1;q22) o translocación (16;16)(p13.1;q22).



Grafica 1. Clasificación de LMA en el ION.



Fig.10 Citometría de flujo multiparamétrica, con uso de FACS Aria II, para diagnóstico de LMA.

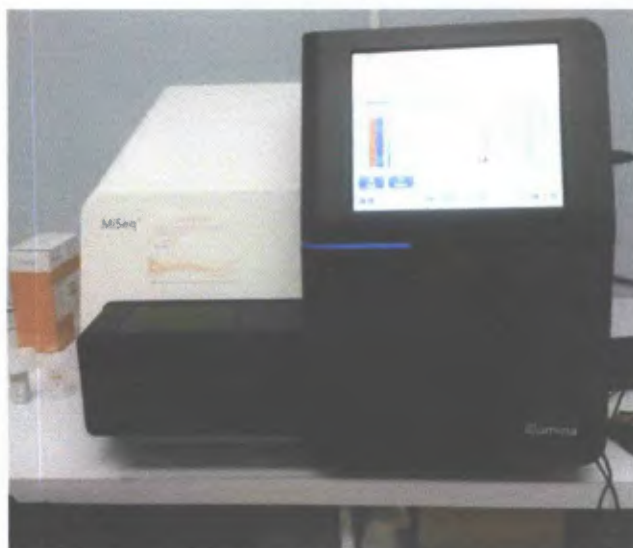


Fig.11 Secuenciación mediante tecnología Illumina, con uso de equipo Miseq.



TABLA 7. GRUPOS DE GENES MUTADOS CON LMA

GRUPOS DE GENES MUTADOS EN LMA									
#		NPM1	TS	DM	SA	FT	MC	COH	SPS
001	2			TET2				STAG2	
002	1		TP53						
003	2						ASXL1	RAD21	
004	2			TET2		CEBPA			
005	2			TET2	FLT3				
006	2			TET2			ASXL1		
007	3		WT1	TET2				RAD21	
008	3			DNMT3A TET2	FLT3				
009	2			TET2	FLT3				
010	1			TET2					
011	4	NPM1		DNMT3A	FLT3 PTPN11				
012	4			IDH2 TET2	FLT3 CSF3R				
013	1				NRAS				
014	2			DNMT3A IDH2					
015	1			TET2					
016	2				PTPN11 NRAS				
017	3				PDGFRA	RUNX1	ASXL1		
018	1								ZRSR2
019	4			TET2		CEBPA GATA2			ZRSR2
020	2			TET2	NRAS				
021	3			TET2	CBL	RUNX1			
022	1				NRAS				
023	4			DNMT3A TET2	FLT3		BCOR		
024	1			TET2					
025	2			TET2	KIT				
026	4			TET2		CUX1	ATRX BCORL1		
027	5			DNMT3A TET2	FLT3		KDM6A		SF3B1
028	1			TET2					
029	2			TET2	NRAS				
030	3	NPM1		TET2	FLT3				
031	1			TET2					
TOTAL	71	2	2	29	19	6	7	3	3
FREC. N=31		6.4	6.4	93.5	61.3	19.3	22.6	9.7	9.7

TS, Supresores de tumores; DM, metiladores de DNA; SA señalización activada; FT, factores de transcripción; MC, remodeladores de cromatina; COH, cohesina; SPS, espliceosoma.

TABLA 8. MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL ION.

#	GEN	MUTACION	#	GEN	MUTACION
001	TET2	p.Ile1762Val	018	ZRSR2	p. Gly438_Ser439insSerArg
	STAG2	p.Cys527Phe	019	TET2	p.Ile1762Val
002	TP53	p.Ala159Pro	020	CEBPA	p. Asn307_Gln313del
003	ASXL1	p.Gly645ValfsTer58		GATA2	p. Arg362Gln
	RAD21	p.Leu451Arg		ZRSR2	p.Gly438_Ser439insSerArg
004	TET2	p. Asn1641MetfsTer19	021	TET2	p.His1778Arg
	CEBPA	p.His24Alafs		NRAS	p.Gly12Ser
005	TET2	p.Val218Met	022	TET2	p.Pro29Arg
	FLT3	p.Leu1721Trp		CBL	p.Ile1762Val
p.Glu598_Tyr598insAspTyrValA spPheArgGluTyr		p.Tyr371His			
006	TET2	p.Pro29Arg	023	RUNX1	p.Arg169LysfsTer44
	ASXL1	p.Ile1762Val			NRAS
007	WT1	p.Gly645ValfsTer58	024	DNMT3A	p.Arg181Ser
	TET2	p.Gly646TrpfsTer12			TET2
008	TET2	p.Arg369Ter			025
	RAD21	p.Pro29Arg	BCOR	p. Thr1531Ser	
009	DNMT3A	p.Ile1762Val	026	TET2	
	TET2	p.Leu451Arg			KIT
010	FLT3	p.Arg882His	027	TET2	p. Asp816Val
	TET2	p.Pro29Arg			CUX1
011	TET2	p.Tyr572Cys	028	ATRAX	p. Tyr204ThrfsTer2
	FLT3	p.Val218Met			BCORL1
012	TET2	p. Val218Met			029
	FLT3	p. Arg595_Leu601dup	TET2	p. Pro29Arg	
013	TET2	p. Leu34Phe	030	FLT3	
	DNMT3A	p.Val218Met			KDM6A
014	FLT3	p.Trp288Cysfs			031
	PTPN11	p. Gln692Ter	TET2	p. Pro29Arg	
015	FLT3	p. Asp835Tyr	032	TET2	
	PTPN11	p. Glu76Val			NRAS
016	IDH2	p. Arg140Gln			033
	TET2	p. His1778Arg	TET2	p. Gly355Asp	
017	FLT3	p. Tyr597delinsTer	034	FLT3	
	CSF3R	p. Thr618Ile			TET2
018	NRAS	p. Gln61Arg			035
	DNMT3A	p. Ile705Thr	NRAS	p. Gly12Asp	
019	IDH2	p. Arg120Lys	036	NPM1	
	TET2	p. Pro363Leu			TET2
020	PTPN11	p. Leu1721Trp			037
	PTPN11	p. Glu69Lys	TET2	p. Phe868Leu	
021	NRAS	p. Gly503Val	038	TET2	
	NRAS	p. Gly12Asp			NRAS
022	PDGFRA	p. Pro567Leu			039
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
023	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	040	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
024	PDGFRA	p. Pro567Leu			041
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
025	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	042	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
026	PDGFRA	p. Pro567Leu			043
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
027	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	044	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
028	PDGFRA	p. Pro567Leu			045
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
029	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	046	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
030	PDGFRA	p. Pro567Leu			047
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
031	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	048	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
032	PDGFRA	p. Pro567Leu			049
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
033	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	050	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
034	PDGFRA	p. Pro567Leu			051
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
035	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	052	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
036	PDGFRA	p. Pro567Leu			053
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
037	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	054	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
038	PDGFRA	p. Pro567Leu			055
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
039	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	056	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
040	PDGFRA	p. Pro567Leu			057
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
041	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	058	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
042	PDGFRA	p. Pro567Leu			059
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
043	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	060	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
044	PDGFRA	p. Pro567Leu			061
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
045	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	062	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
046	PDGFRA	p. Pro567Leu			063
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
047	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	064	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
048	PDGFRA	p. Pro567Leu			065
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
049	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	066	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
050	PDGFRA	p. Pro567Leu			067
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
051	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	068	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
052	PDGFRA	p. Pro567Leu			069
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
053	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	070	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
054	PDGFRA	p. Pro567Leu			071
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
055	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	072	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
056	PDGFRA	p. Pro567Leu			073
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
057	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	074	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
058	PDGFRA	p. Pro567Leu			075
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
059	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	076	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
060	PDGFRA	p. Pro567Leu			077
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
061	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	078	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
062	PDGFRA	p. Pro567Leu			079
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
063	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	080	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
064	PDGFRA	p. Pro567Leu			081
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
065	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	082	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
066	PDGFRA	p. Pro567Leu			083
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
067	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	084	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
068	PDGFRA	p. Pro567Leu			085
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
069	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	086	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
070	PDGFRA	p. Pro567Leu			087
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
071	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	088	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
072	PDGFRA	p. Pro567Leu			089
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
073	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	090	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
074	PDGFRA	p. Pro567Leu			091
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
075	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	092	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
076	PDGFRA	p. Pro567Leu			093
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
077	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	094	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
078	PDGFRA	p. Pro567Leu			095
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
079	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	096	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
080	PDGFRA	p. Pro567Leu			097
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
081	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	098	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS
082	PDGFRA	p. Pro567Leu			099
	RUNX1	p. Glu138Lys	NRAS	p. Gly12Asp	
083	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12	100	TET2	
	ASXL1	p. Gly646TrpfsTer12			NRAS



TABLA 9. FRECUENCIA DE GEN MUTADO EN PACIENTES CON LMA

GEN MUTADO	Nº DE PACIENTES	FRECUENCIA (N=31)
TET2	22	64.5
FLT3	8	25.8
DNMT3A	5	16.1
NRAS	5	16.1
ASXL1	3	9.7
RAD21	2	6.4
NPM1	2	6.4
IDH2	2	6.4
CEBPA	2	6.4
RUNX1	2	6.4
PTPN11	2	6.4
ZRSR2	2	6.4
KIT	1	3.2
TP53	1	3.2
WT1	1	3.2
CSF3R	1	3.2
GATA2	1	3.2
STAG2	1	3.2
SFR3B1	1	3.2
KDM6A	1	3.2
PDGFRA	1	3.2
CBL	1	3.2
CUX1	1	3.2
BCOR	1	3.2
BCORL1	1	3.2
ATRX	1	3.2

## DISCUSION

La tecnología de secuenciación ha permitido la generación de información incomparable permitiendo dilucidar la heterogeneidad clonal de la Leucemia Mieloide Aguda. En nuestro estudio se pudo constatar dicha heterogeneidad clonal al encontrar un promedio de 2 mutaciones por paciente de 54 genes analizados.

La edad media de nuestra población 40 años difiere del resto encontrado en Estados Unidos y Europa que es de 67 años donde se tiene un registro formal de los subtipos de esta enfermedad. Pero concuerda con los estudios en México con una edad promedio de 43 años, Brasil con 47 años e India con 40 años (Lima *et al* 2015) (Philip *et al* 2015) (Gomez *et al* 2017).

La Leucemia Promielocítica Aguda con PML RARA (LPA con PML RARA) fue el subtipo más frecuente en nuestra población. Siendo el 42%(13/31) con una edad promedio de 37 años. En México, Gomez y colaboradores reportan un 38.3% de LPA con PML RARA y una edad promedio de 37 años. Los 13 pacientes también presentaron una co-ocurrencia de mutaciones como lo son metiladores/demetiladores de ADN en 11/13 (TET2 DNMT3A) 4/13 señalización activada (FLT3 ITD FLT3 TKD PTPN11 NRAS) y menor proporción remodeladores de cromatina, complejo de cohesina y factores de transcripción. Cabe señalar entre las mutaciones más comunes reportadas en este subtipo están mutaciones de FLT3(ITD TKD) y mutaciones en WT1 (Papaemmanuil *et al* 2016) y (Fasan *et al* 2017). Ibañez M y colaboradores en 2016 llevaron a cabo un estudio de mutaciones somáticas por secuenciamiento del exoma (WES) y genoma (WGS) a pacientes con APL describiendo cientos de mutaciones llegando a la hipótesis de que la alteración causada por mutaciones no necesariamente recurrentes en las funciones biológicas clave es más importante que el número o las combinaciones específicas de mutaciones en este subtipo.

93.5% de los genes mutados se encontraron en metiladores/desmetiladores de ADN (TET2 DNMT3A IDH2) y 22.6% se presentaron en grupos remodeladores de cromatina (ASXL1) apoyando las investigaciones de Corces Zimmerman MR y colaboradores en

2014 Shlush LI y colaboradores en 2014 y el estudio de cohorte de 1540 pacientes de Papaemmanuil y colaboradores en 2016 donde las mutaciones envueltas en regulacion epigenetica ocurren como los primeros eventos fundadores en celulas progenitoras preleucemicas antes de eventos leucemogenicos y persisten en toda la enfermedad En este mismo cohorte agruparon las mutaciones en genes reguladores de espliceosoma o RNA splicing (SRSF2 SF3B1 U2AF1 ZRSR2) cromatina (ASXL1 STAG2 BCOR MLLPTD EZH2 PHF6) transcripcion (RUNX1) y lo nombraron grupo cromatina espliceosoma

El 25 8%(8/31) de la poblacion en estudio presento la mutacion en el gen FLT3 Un 9 6% presento la mutacion en el dominio tirosin kinasa (FLT3 TKD) 16% presento mutaciones en el dominio juxtamembrana (FLT3 ITD) En un estudio multicentrico en Latinoamerica se presento un 20 28% de mutacion FLT3 ITD (Cuervo Sierra et al 2013 Jimenez et al 2010) Papaemmanuil y colaboradores observaron una alteracion de FLT3 ITD en hasta un 22% de un cohorte de 1 540 pacientes con LMA Siendo esta mutacion de pronostico desfavorable cobra importancia su deteccion temprana ya que estos pacientes se beneficiarian de ensayos clinicos con terapia que inhibe la tirosin quinasa y/o un trasplante de celulas progenitoras hematopoyeticas

Solo 2 pacientes mostraban mutacion en NPM1 sin embargo ambos estaban asociados a mutaciones FLT3 TKD lo que sugiere una mayor sobrevida libre de enfermedad encontrada en estos pacientes (Boddu P et al 2017) NPM1 se encontro asociado a DNMT3A FLT3 TKD PTPN11 RAD21 en un 6 4% una frecuencia menor a los datos de Grimwade y Papaemmanuil aunque concuerda con los grupos de genes mutados 5 pacientes mostraron mutaciones en NRAS Asociados a PML RARA TET2 PTPN11 inv(16)(p13 q22) t(6 9)(p23 q34 1) Las mutaciones se encontraron mayormente en p Gly12Asp p Gly12Ser p Gln61Arg Bacher U y colaboradores en 2017 encontraron en su mayoria mutaciones de NRAS en codones 12 13 y 61 con alta frecuencia de asociacion a inv(16)/t(16 16) e inv(3)/t(3 3)

Encontramos similitudes en las principales categorias de genes mutados y su asociacion con otras mutaciones reportadas por Grimwade D y colaboradores en 2016 Siendo estos los Genes relacionados a metilacion de ADN TET2 DNMT3A IDH2 asociados a

FLT3 ITD FLT3 TKD Los Genes de señalización FLT3 ITD FLT3 TKD PTPN11  
CBL NRAS Los Supresores de tumores encontrados WT1 asociado a TET2 y RAD21  
TP53

Los Factores de transcripción tipo CEBPA asociado a GATA2 TET2 lo encontramos en  
6 4% si bien en nuestra población CEBPA es heterocigoto concuerda con el estudio de  
cohorte de Fasan A y colaboradores en 2014

## CONCLUSIONES

- 1 En este estudio se pudo constatar que en nuestra poblacion se detectaron 71 mutaciones con un promedio de 2 mutaciones por paciente Demostrando asi la heterogeneidad clonal de la LMA
- 2 Por primera vez se tienen datos de Biologia Molecular de la clasificacion de subtipos de LMA en Panama
- 3 Se demostro que los grupos de riesgo citogenetico de LMA en nuestra poblacion corresponden con estudios poblacionales reportados encontrando concordancia con la alta frecuencia de Leucemia Promielocitica Aguda encontrada en Latinoamerica
- 4 Encontramos similitudes en los genes de importancia clinica mas relevantes de la serie de estudios comparados
- 5 Este trabajo puede ser utilizado para determinar nuevas estrategias de terapias que sean personalizadas y efectivas para el paciente con LMA

## **RECOMENDACIONES**

- 1 Expandir el universo de estudio para obtener tener mayor inferencia en valores poblacionales
- 2 Analizar otros genes o regiones no incluidas en este estudio
- 3 Documentar los subtipos moleculares de LMA en nuestra region ya que los datos encontrados en Latinoamerica son escasos

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahn Jeung Yeal Seo Katie Weinberg Olga Boyd Scott D Arber Daniel A (2009) A Comparison of Two Methods for Screening CEBPA Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia *J Mol Diagn* 11 319–323

Akalin A Garrett Bakelman F Kormaksson M Busuttil J Zhang L Khrebtukova I Figueroa M E (2012) Base Pair Resolution DNA Methylation Sequencing Reveals Profoundly Divergent Epigenetic Landscapes in Acute Myeloid Leukemia *PLoS Genetics* 8(6) e1002781 <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002781>

Arber DA Orazi A Hasserjian R et al (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia *Blood* 127(20) 2391–2405

Betz BL Hess JL 2010 Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century *Arch Pathol Lab Med* 134 1427–1433

Churpek JE Godley LA 2016 How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies *Blood* 128(14) 1800–1813

Cuervo Sierra J Gomez Almaguer D Jaime Perez JC Martinez Hernandez RA Garcia Sepulveda RD Sanchez Cardenas M Ignacio Ibarra G Muciño Hernandez G Arana Trejo RM Ruiz Arguelles GJ Ruiz Delgado G Lutz Presno J Jimenez Mejia AM Vasquez Palacio G Camargo Guerrero M (2013) Prevalence of FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia A Multicenter Latin America Study *Blood* 122 4979

Devillier R Mansat De Mas V Gelsi Boyer V Demur C Murati A Corre J Birnbaum D (2015) Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia related changes *Oncotarget* 6(10) 8388–8396

Dohner H Weisdorf DJ Bloomfield CD (2015) Acute myeloid leukemia *N Engl J Med* 373 1136–1152

Dohner H Estey E Grimwade D Amadori S Appelbaum F R Buchner T Bloomfield C D (2017) Diagnosis and management of AML in adults 2017 ELN recommendations from an international expert panel *Blood* 129(4) 424–447

Douer D Santillana S Ramezani L Samanez C Slovak ML Lee MS et al (2003) Acute promyelocytic leukemia in patients originating in Latin America is associated with an increased frequency of the bcr1 subtype of the PML/RAR alpha fusion gene *Br J Hematol* 122(4) 563–570

Estey EH (2014) Acute myeloid leukemia 2014 update on risk stratification and management *Am J Hematol* 89 1063–1081

Fasan A Haferlach C Perglerova K Kern W & Haferlach T (2017) Molecular landscape of acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse *Haematologica* 102(6) e222–e224 <http://doi.org/10.3324/haematol.2016.162206>

Falini B Bolli N Liso A Martelli M Mannucci R Pileri S and Nicoletti I (2009) Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications *Leukemia* 23 1731–1743

Ferlay J Soerjomataram I Dikshit R Eser S Mathers C Rebelo M Parkin DM Forman D Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 *Int J Cancer* Mar 1 136(5)

Fey MF Buske C (2013) on behalf of the ESMO Guidelines Working Group: Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up *Ann Oncol* 24 (suppl 6) vi138–vi143



Friedman A D (2015) C/EBP $\alpha$  in normal and malignant myelopoiesis *International Journal of Hematology* 101(4) 330–341 <http://doi.org/10.1007/s12185-015-1764-6>

Gaidzik V I et al (2016) RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico pathologic and genetic features *Leukemia* 30 2160–2168

Gelsi Boyer V Brecqueville M Devillier R Murati A Mozziconacci M J & Birnbaum D (2012) Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases *Journal of Hematology & Oncology* 5 12 <http://doi.org/10.1186/1756-8722-5-12>

Gomez Almaguer D Marcos Ramirez E R Montano Figueroa E H Ruiz Arguelles G J Best Aguilera C R Lopez Sanchez M D C Barrera Chairez E Jaime Perez J C (2017) Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World the Mexican Perspective *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 17 (1) pp 46–51

Grimwade D Hills RK Moorman AV Walker H Chatters S Goldstone AH et al (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials *Blood* 116 354–365

Hasle H Abrahamsson J Arola M Karow A O'Marcaigh A Reinhardt D et al (2008) Myeloid leukemia in children 4 years or older with Down syndrome often lacks GATA1 mutation and cytogenetics and risk of relapse are more akin to sporadic AML *Leukemia* 22(7) 1428–30

Head S R Komori H K LaMere S A Whisenant T Van Nieuwerburgh F Salomon D R & Ordoukhanian P (2014) Library construction for next-generation sequencing Overviews and challenges *BioTechniques* 56(2) 61–passim <http://doi.org/10.2144/000114133>

Hirabayashi S Wlodarski M W Kozyra E & Niemeyer C M (2017) Heterogeneity of GATA2 related myeloid neoplasms *International Journal of Hematology* 106(2) 175-182

Howlader N Noone AM Krapcho M Miller D Bishop K Kosary CL Yu M Ruhl J Tatalovich Z Mariotto A Lewis DR Chen HS Feuer EJ Cronin KA (2016) *SEER Cancer Statistics Review 1975-2014* National Cancer Institute Bethesda MD [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014) Based on November 2016 SEER data submission National Cancer Institute

Hoyos M1 Nomdedeu JF Esteve J Duarte R Ribera JM Llorente A Escoda L Bueno J Tormo M Gallardo D de Llano MP Martí JM Aventin A Mangues R Brunet S Sierra J (2013) Core binding factor acute myeloid leukemia: the impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease *Eur J Haematol* Sep 91(3) 209-18

Hulegardh E Nilsson C Lazarevic V Garelius H Antunovic P Rangert Derolf Å Mollgard L Uggla B Wennstrom L Wahlin A Hoglund M Juliusson G Stockelberg D and Lehmann S (2015) Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population based setting: A report from the Swedish Acute Leukemia Registry *Am J Hematol* 90 208-214 doi:10.1002/ajh.23908

Janke H Pastore F Schumacher D Herold T Hopfner K P Schneider S et al (2014) Activating FLT3 Mutants Show Distinct Gain of Function Phenotypes In Vitro and a Characteristic Signaling Pathway Profile Associated with Prognosis in Acute Myeloid Leukemia *PLoS ONE* 9(3) e89560 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089560>

Jimenez Mejia Angelica Maria Torres Jose Domingo Cuellar Ambrossy Francisco Muskus Carlos Camargo Mauricio Vasquez Palacio Gonzalo (2010) Determinacion de las mutaciones en los genes FLT3 y NPM1 en pacientes con leucemia mieloide aguda Colombia *Iatreia* ISSN 0121-0793 vol 23 fasc 4 S

Li S Mason C & Melnick A (2016) Genetic and Epigenetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia *Current Opinion in Genetics & Development* 36 100–106 <http://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.011>

Lima AS de Mello MR Fernandes E Bezerra MF Oliveira MM et al (2015) Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real life setting *Blood* 126(15) 1863–5

Madan V Shyamsunder P Han L Mayakonda A Nagata Y Sundaresan J Koeffler H P (2016) Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia *Leukemia* 30(8) 1672–1681 <http://doi.org/10.1038/leu.2016.69>

McKerrell T Park N Moreno T et al (2015) Understanding Society Scientific Group Leukemia associated somatic mutations drive distinct patterns of age related clonal hemopoiesis *Cell Reports* 10(8) 1239–1245

Mrozek K Marcucci G Nicolet D Maharry KS Becker H Whitman SP Metzeler KH Schwind S Wu YZ Kohlschmidt J Pettenati MJ Heerema NA Block AW Patil SR Baer MR Kolitz JE Moore JO Carroll AJ Stone RM Larson RA Bloomfield CD (2012) Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia *J Clin Oncol* Dec 20 30(36) 4515–23

Owen C Barnett M Fitzgibbon J (2008) Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review *British Journal of Haematology* 140 123–132

Papaemmanuil E Gerstung M Bullinger L et al (2016) Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia *N Engl J Med* 374(23) 2209–2221 [doi:10.1056/NEJMoa1516192](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192)

Paschka P Schlenk R F Gaidzik V I Herzig J K Aulitzky T Bullinger L Dohner K (2015) ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid

leukemia a study by the German Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group  
*Haematologica* 100(3) 324–330

Pawar R Balı O P S Malhotra B K & Lamba G (2014) Recent advances and novel agents for FLT3 mutated acute myeloid leukemia *Stem Cell Investigation* 1 7  
<http://doi.org/10.3978/j.issn.2306.9759.2014.03.03>

Philip C George B Ganapule A Korula A Jain P Alex A A Lakshmi K M Sitararam U Abubacker F N Abraham A Viswabandya A Srivastava V M Srivastava A Balasubramanian P and Mathews V (2015) Acute myeloid leukaemia challenges and real world data from India *Br J Haematol* 170 110–117  
doi 10.1111/bjh.13406

Port M Bottcher M Thol F Ganser A Schlenk R Wasem J Neumann A Pouryamout L (2014) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication nucleophosmin 1 and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years a systematic review and meta analysis *Ann Hematol* 93 1279 <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2072-6>

Qiagen (2016) QIAamp DNA Mini Blood Mini Hand book for DNA purification from whole blood plasma serum buffy coat lymphocytes dried blood spots(QIAamp DNA Mini Kit only) body fluids culture cells swabs and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)

Ran D Lam K Shia W J Lo M C Fan J B Knorr D A Zhang D E (2013) Response the role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells *Blood* 121(26) 5252–5253 <http://doi.org/10.1182/blood.2013.04.494914>

RNCP MINSA (2015) Informe General de Situacion del Actual Registro Nacional del Cancer en Panama via WEB Año 2012 2015  
[http://190.34.154.93/rncp/sites/all/files/informe\\_de\\_situacion\\_del\\_rncp\\_16\\_07\\_15.pdf](http://190.34.154.93/rncp/sites/all/files/informe_de_situacion_del_rncp_16_07_15.pdf)

Sanchez Aguilera A & Mendez Ferrer S (2017) The hematopoietic stem cell niche in health and leukemia *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(4) 579–590  
<http://doi.org/10.1007/s00018-016-2306-y>

Shah A Andersson TM Rachev B Björkholm M Lambert PC (2013) Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England 1971–2006: a population based study

*Br J Haematol* 162: 509–516

Sill H Olipitz W Zebisch A Schulz E Wolfler A (2011) Therapy related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics *Br J Pharmacol* 162: 792–805

Snyder Robert (2012) Benzene and Leukemia *Int J Environ Res Public Health* Aug 9(8): 2875–2893

Swerdlow SH Campo E Harris NL Jaffe ES Pileri SA Stein H Thiele J Vardiman JW IARC (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Edition 6: 110–147

Taskesen E Bullinger L Corbacioglu A Sanders MA Erpelinck CA Wouters B J van der Poel van de Luytgaarde SC Damm F Krauter J Ganser A Schlenk R F Lowenberg B Delwel R Dohner H Valk PJ & Dohner K (2011) Prognostic impact: concurrent genetic mutations and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity *Blood* 117(8): 2469–2475  
Accessed October 03, 2017 <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307280>

TCGARN (The Cancer Genome Atlas Research Network) (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia *N Engl J Med* 368: 2059–74

Illumina (2016) TruSight Myeloid Sequencing Panel Reference Guide (15054779) [https://support.illumina.com/content/dam/illumina\\_support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/trusight/trusight\\_myeloid\\_sequencing\\_panel\\_reference\\_guide\\_15054779\\_02.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina_support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/trusight_myeloid_sequencing_panel_reference_guide_15054779_02.pdf)

Walter RB Othus M Borthakur G Ravandi F Cortes JE Pierce SA et al (2011), Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores a novel paradigm for treatment assignment *J Clin Oncol* 29 4417–4423

Wilson N K Kent D G Buettner F Shehata M Macaulay I C Calero Nieto F J Gottgens B (2015) Combined Single Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations *Cell Stem Cell* 16(6) 712–724 <http://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.004>

Wong T N Ramsingh G Young A L Miller C A Touma W Welch J S Wilson R K (2015) The Role of TP53 Mutations in the Origin and Evolution of Therapy Related AML *Nature* 518(7540) 552–555 <http://doi.org/10.1038/nature13968>

Yanada M Kurosawa S Yamaguchi T et al (2012) Prognosis of acute myeloid leukemia harboring monosomal karyotype in patients treated with or without allogeneic hematopoietic cell transplantation after achieving complete remission *Haematologica* 97 915–8

Yin JA O'Brien MA Hills RK Daly SB Wheatley K Burnett AK (2012) Minimal residual disease monitoring by quantitative RT PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse results of the United Kingdom MRC AML 15 trial *Blood* Oct 4 120(14) 2826–35

Zon LI (2008) Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem cell self renewal *Nature* 453 306–13

Zou Q Tan S Yang Z Zhan Q Jin H Xian J Zhang S Yang L Wang L Zhang L (2017) NPM1 Mutant Mediated PML Delocalization and Stabilization Enhances Autophagy and Cell Survival in Leukemic Cells *Theranostics* 7(8) 2289–2304 doi 10.7150/thno.19439 Available from <http://www.thno.org/v07p2289.htm>